

**Aus der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin
Abteilung Kinderheilkunde I mit Poliklinik
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. med. R. Handgretinger**

**Quantifizierung der Thymusfunktion nach hämatologischer
Stammzelltransplantation im Kindesalter**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

**Vorgelegt von
Nikolay Marinov Tzaribachev
aus
Sofia, Bulgarien**

2005

Dekan:

Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichtstatter:

Professor Dr. D. Niethammer

2. Berichtstatter:

Professor Dr. L. Kanz

Meinen Eltern

und

meinen Mentoren

Herrn Dr. rer. nat. h.c. Hans-Werner Hector

und

Herrn Thomas Schleicher

Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung	2
	I.1. Prinzip	2
	I.2. Immunrestitution	6
	I.3. Der Thymus und seine Funktion	7
	I.4. Ziel der Arbeit	10
II.	Material und Methoden	11
	II.1. Patientendaten und Einschlusskriterien	11
	II.2. Reagenzien und Geräte	13
	II.3. Methoden	14
	Aufarbeitung der Proben und FACS Analyse	14
	TREC-Assay	17
	Statistik	18
III.	Ergebnisse	20
	III.1. TREC-Gehalt, absolute TRECs und Anzahl naiver T-Zellen	20
	III.2. Intrazelluläre Ki67-Expression in peripheren T-Zellen	21
	III.3. Einflussfaktoren für den Beginn der Thymusaktivität T_{\min}	23
	III.4. Einflussfaktoren auf das Plateau P der Thymusfunktion	25
IV.	Diskussion	26
V.	Zusammenfassung	31
VI.	Literaturverzeichnis numerisch	33

Quantifizierung der Thymusfunktion nach hämatologischer Stammzelltransplantation im Kindesalter

I. Einleitung

I.1 Prinzip

Die Transplantation von hämatopoetischen Stammzellen ist heute ein viel verwendetes, gut etabliertes Verfahren zur kurativen Behandlung von malignen und nichtmalignen Erkrankungen. Das Prinzip der Transplantation hämatopoetischer Vorläuferzellen besteht darin, zunächst durch aggressive Chemotherapie und ggf. Ganzkörperbestrahlung das eigene blutbildende System zu zerstören (Konditionierung). Bei malignen Erkrankungen wird dadurch auch der Untergang von noch im Empfänger vorhandenen Tumorzellen angestrebt. Danach erfolgt die Transplantation autologer oder allogener hämatopoetischer Vorläuferzellen. Dies geschieht durch intravenöse Verabreichung von Stammzellen aus dem Knochenmark oder dem peripheren Blut, die sich in der Folge direkt im Knochenmark des Empfängers ansiedeln. In der ersten Phase nach Transplantation kommt es zur sogenannten hämatologischen Rekonstitution, d.h. der Neubildung von Zellen der roten und weißen Reihe sowie von Thrombozyten. Danach erfolgt die Wiederherstellung der spezifischen und unspezifischen Immunität (T-, B- und NK-Zellen), die sogenannte immunologische Rekonstitution. In der Zeit bis zur Wiederherstellung der letzteren ist der Organismus gegenüber Krankheitserregern nur bedingt abwehrfähig und bedarf sorgfältiger Überwachung. Ein wichtiger Aspekt des ganzheitlichen Managements nach Transplantation ist somit der Schutz des Organismus gegenüber infektiösen Erregern sowie Tumorrezidiven. Dieses wird erst durch die Wiederherstellung des Immunsystems und dessen Funktion erreicht.

Die ersten Versuche einer Transplantation hämatopoetischer Stammzellen aus komplettem Knochenmark wurden Anfang der siebziger Jahre durchgeführt [55]. Eine Knochenmarktransplantation bedeutet die Entnahme von Knochenmark aus einem Spender und intravenöse Gabe an einen Empfänger. Übertragen wurde zunächst ausschließlich Knochenmark von HLA-identischen Geschwistern [41,42].

Das **HLA**-(Human Leucocyte Antigen) Systems des Menschen trägt zur Unterscheidung zwischen körpereigenen und fremden Proteinen durch das

Immunsystem bei. HLA-Klasse I Moleküle sind auf der Oberfläche aller kernhaltigen Zellen des menschlichen Organismus nachweisbar, Klasse II Moleküle finden sich hauptsächlich auf kernhaltigen Zellen des hämatopoetischen Systems. Transplantationsrelevante HLA-Moleküle sind die Antigene der Loci A und B (Klasse I) und DR sowie DQ (Klasse II).

Vor ca. 15 Jahren erfolgten dann die ersten Ansätze zur Transplantation peripherer Stammzellen, anfangs von HLA-identischen Geschwistern, später auch von unverwandten Spendern oder in den letzten Jahren von einem HLA-haploidentischen (oder auch halbidentisch) Elternteil [43-48]. Da für die Stammzelltransplantation nicht immer ein völlig HLA-identischer Spender zur Verfügung steht, greift man heute in zunehmendem Masse auf haploidentische Spender, meistens Geschwister oder Eltern, zurück. Dieses Verfahren ist aber noch nicht in großem Umfang etabliert, obgleich in einigen Zentren Ergebnisse damit erreicht wurden, die denen bei der Verwendung von unverwandten Spendern entsprechen.

Im Gegensatz zur Knochenmarkstransplantation werden bei einer Stammzelltransplantation dem Spender, der zuvor mit dem hämatopoetischen Wachstumsfaktor G-CSF (granulocyte colony stimulation factor) stimuliert wurde, große Mengen an Leukozyten aus dem peripheren Blut entnommen, unter denen sich auch die erforderlichen blutbildenden Stammzellen befinden. Aus diesem stammzellhaltigen Leukozytenpräparat können $CD34^+$ oder $CD133^+$ hämatopoetische Stammzellen mit Hilfe der MACS-Technologie (magnet activated cell sorting- Magnet aktivierte Zellsortierung) angereichert werden. Die Gewinnung von Stammzellen aus dem peripheren Blut wurde allerdings erst durch die Entdeckung der hämatopoetischen Wachstumsfaktoren G-CSF und GM-CSF möglich. Ihr Einsatz führt zur vermehrten Ausschüttung von Stammzellen aus ihrem natürlichen Reservoir, dem Knochenmark, in das periphere Blut.

Indikationen zur Stammzelltransplantation stellen verschiedene maligne und nicht maligne Erkrankungen, vor allem des blutbildenden Systems (Leukämien, aplastische Anämien), des Immunsystems (Immundefekte, autoimmune Erkrankungen wie z.B. der

Morbus Still der systemischen Form der juvenilen idiopathischen Arthritis) sowie angeborene Stoffwechselstörungen (z.B. die metachromatische Leukodystrophie) dar [4-9].

Es gibt verschiedene Formen der Transplantation peripherer Stammzellen, je nach Verwandtschaftsgrad zwischen Spender und Empfänger[41, 43]. Demzufolge unterscheiden wir die autologe und allogene Stammzelltransplantation. Bei der **autologen** Transplantation handelt es sich um Patienten, deren Erkrankung das eigene blutbildende System nicht betrifft beziehungsweise keine Knochenmetastasen vorliegen. Hier bilden Patienten mit einer akuten myeloischen Leukämie eine Ausnahme, die in manchen Zentren autolog transplantiert werden. Im Rahmen der erforderlichen Hochdosischemotherapie/-bestrahlung (Konditionierung) geht das Knochenmark sowie das Immunsystem zugrunde. Danach erfolgt die Rekonstitution der Blutbildung aus den eigenen, vorher asservierten und nach der Konditionierung transplantierten hämatopoetischen Vorläuferzellen. Demzufolge sind bei diesem Modus der Transplantation Spender und Empfänger identisch. Auf diese Weise wird durch die Wiedergabe körpereigener Stammzellen die Gefahr von Abstoßungsreaktionen (**graft versus host** = Transplant gegen Wirt, **GvH** oder **host versus graft** = Wirt gegen Transplant, **HvG**) umgangen und somit die therapieassoziierte Morbidität und Mortalität reduziert [41, 43]. Als Nachteil der autologen Stammzelltransplantation sei zu nennen, dass eine Reinfusion von Tumorzellen oft nicht vollständig zu vermeiden ist. Auch muss an dieser Stelle hervorgehoben werden, dass ein erwünschter **GvL** (**graft versus leukemia** = Transplant gegen Leukämie) Effekt ausbleiben wird [49]. Dabei handelt es sich um eine selektive Fremderkennung von Empfängergewebe (und damit auch von Tumorzellen) durch das Transplantat und deren Zerstörung. Eine eindeutige Trennung von GvH- und GvL- Effekt ist zum derzeitigen Zeitpunkt der Entwicklung leider noch nicht möglich.

Eine **allogene** Stammzelltransplantation wird bei malignen, das blutbildende System selbst betreffenden Erkrankungen oder Stoffwechselstörungen erforderlich [43-48]. In diesem Fall würde eine autologe Transplantation durch die Reinfusion erkrankter Stammzellklone sinnlos sein. Bei der allogenen Stammzelltransplantation werden nicht

die eigenen hämatopoetischen Vorläuferzellen, sondern die von einem verwandten oder nicht verwandten Spender dem Empfänger übertragen. Die Gefahr der Transfusion erkrankter Zellen ist somit beseitigt, jedoch die Möglichkeit der Entwicklung von Abstoßungsreaktionen (GvH oder HvG) deutlich größer als bei der autologen Stammzelltransplantation. Als positiver Effekt sei hier noch einmal die Möglichkeit einer GvL- Reaktion bei allogenen Transplantationen genannt [49].

Wie bereits weiter oben angedeutet, werden hauptsächlich zwei Formen der Abstoßungsreaktion, *host versus graft Reaktion(HvGR)* und *graft versus host Reaktion(GvHR)*, unterschieden. Vermittelt werden diese Reaktionen durch zytotoxische T-Zellen unter Mitwirkung des bereits erwähnten HLA- Systems. Die Voraussetzung für die HvGR ist das Vorhandensein von Zellen aus dem körpereigenen, durch die Konditionierung nicht zerstörten oder ungenügend supprimierten Immunsystems. Die wirtseigenen Immunzellen erkennen in diesem Fall das Transplantat als fremd und induzieren dessen Abstoßung. Um einen solchen Effekt weitgehend zu vermeiden, wird in der Regel vor der Transplantation vorbeugend eine myeloablative Konditionierung durchgeführt, die allerdings die Abstoßung nicht immer verhindern kann. Eine GvHR kann dann auftreten, wenn bei der Transplantation von hämatopoetischen Vorläuferzellen auch reife T-Lymphozyten mittransplantiert werden. Dann besteht die Gefahr, dass diese die körpereigenen Zellen des Empfängers als fremd erkennen und deren Zerstörung in Gang setzen. Am häufigsten sind Haut, Darm und Leber betroffen. Um diesen unerwünschten Effekt einer Stammzelltransplantation zu vermeiden, können die T-Zellen vor der Transplantation aus dem Präparat entfernt werden, diesen Vorgang nennt man T-Zelldepletion. Eine T-Zelldepletion kann die Inzidenz und den Schweregrad einer GvHR signifikant vermindern, gleichzeitig hat sie jedoch einen negativen Einfluss auf die Rekonstitution des T-Zellsystems. Bei einer haploidentischen Transplantation, bei der Spender und Empfänger halb- HLA- identisch sind, würde es ohne die vorherige Entfernung der T- Zellen aus dem Transplantat praktisch immer zu einer tödlich endenden GvHR kommen.

I.2 Immunrekonstitution

Nach Konditionierung und Transplantation erfolgt bei unkompliziertem Verlauf die rasche Wiederherstellung des hämatopoetischen Systems sowie der unspezifischen zellulären Immunität (repräsentiert durch natürliche Killer (NK)-Zellen, Monozyten, Makrophagen). In der Regel ist diese innerhalb eines Monats abgeschlossen. Die Entwicklung der komplizierter strukturierten spezifischen, zellulären Immunität (B- und T-Zellen) benötigt jedoch wesentlich mehr Zeit.

Bei lymphopenischen Patienten nach einer Stammzelltransplantation bestehen prinzipiell zwei Wege der T-Zellrekonstitution: antigengetriggerte, periphere Expansion reifer, mittransplantierter T-Zellen sowie die *de novo* Generierung naiver Zellen im Thymus aus den transplantierten hämatopoetischen Vorläuferzellen [1, 2]. Der erste Weg führt zur Wiederherstellung von Gedächtnis-T-Zellen, deren Diversität des T-Zellrezeptorrepertoires von der Anzahl der T-Zellvorläufer im Transplantat abhängt. Der zweite Weg entspricht mehr der normalen Ontogenese der T-Zellen und führt zur kompletten Rekonstitution eines voll ausgereiften T-Zellkompartimentes.

In vorangegangenen Studien konnten wir zeigen, dass in der frühen Regenerationsphase nach allogener Stammzelltransplantation periphere T-Zellen zunächst ein sehr eingeschränktes T-Zellrezeptorrepertoire aufweisen und Merkmale reifer, aktivierter T-Zellen tragen [20, 35]. Dieses Muster ist bei allen Transplantationsformen gleich, jedoch zeigten haploident transplantierte Patienten, die mehr Stammzellen erhalten hatten, eine schnellere Regeneration als Empfänger von Fremdspendertransplantaten mit niedrigeren Zellzahlen [20, 35]. Die Diversität und Komplexität des T-Zellrezeptorrepertoires nimmt erst zu, wenn naive T-Zellen im peripheren Blut auftauchen. Dies kann bei erwachsenen Patienten Monate bis Jahre dauern. Bei Kindern schreitet dieser Regenerationsprozess deutlich schneller voran, so dass sich das T-Zellrezeptorrepertoire nach dem Tag 200 bereits nicht mehr von dem einer gesunden Vergleichsperson unterscheidet [56]. Aus diesen Daten wurde geschlossen, dass der Beginn der Thymus-abhängigen T-Zellrekonstitution bei Kindern ca. 6 Monate nach Transplantation beginnt und danach rasch voranschreitet. Allerdings konnten mit den in diesen Studien verwendeten Techniken keine sicheren Aussagen über den exakten Beginn und das Ausmaß der Thymusauswurfleistung gemacht werden.

Es besteht weitgehende Übereinstimmung in der Annahme, dass die *de novo* Generierung kompetenter T- Zellen vom Vorhandensein eines funktionsfähigen Thymus abhängig ist [3]. Aufgrund fehlender spezifischer Marker für frisch aus dem Thymus emigrierte naive T-Zellen und der uneindeutigen Interpretation naiver T-Zellmarker im peripheren Blut bestanden bis vor kurzem noch Schwierigkeiten bei der präzisen Quantifizierung der Thymusfunktion. Neue Erkenntnisse über die Mechanismen der T-Zellreifung und der dabei stattfindenden Umlagerung der T-Zellrezeptorgene [6, 7] haben zur Entwicklung des T-cell receptor excision circles- (TREC) Assays [4, 8] geführt, der in einer Reihe von klinischen Situationen zur Analyse der Thymusfunktion bereits verwendet worden ist [9-17] und im folgenden kurz beschrieben werden soll (s. Abb. 1).

I.3 Der Thymus und seine Funktion

Die Vorläufer der T-Lymphozyten werden wie alle anderen hämatopoetischen Zellen im Knochenmark gebildet, wandern dann aber als sehr unreife Vorstufen über die Blutbahn in den Thymus ein. Hier durchlaufen sie verschiedene Phasen der Proliferation und Ausreifung und erlangen auf diesem Wege ihre immunologische Kompetenz. Für die Bedeutung des Thymus als einziges Organ, dem diese Funktion zufällt, sprechen die Erkenntnisse aus zwei Mausmodellen – **SCID**- und Nacktmäusen. **SCID** steht für **severe combined immune deficiency** (schwere kombinierte Immundefizienz), dem ein angeborener Defekt in der Rekombination der T-Zellrezeptorgene für die gemeinsame λ -Kette der Rezeptoren für verschiedene Zytokine (IL-2, -4, -7, -9, -15), welcher normalerweise während der Ausreifung der Lymphozyten im Thymus stattfindet, zugrunde liegt. Somit sind bei diesen Mäusen im peripheren Blut trotz vorhandenem Thymus kaum T-Lymphozyten nachweisbar. Mäuse, die kein Fell haben, werden als Nacktmäuse bezeichnet. Dieser Mäusestamm ist durch das Fehlen des Thymus und sehr niedrige T-Zellzahlen im peripheren Blut charakterisiert. Dabei haben sie eine normale Funktion des Knochenmarkes. Wird nun Knochenmark einer Nacktmaus in eine SCID-Maus transplantiert, reifen in der letzteren normale T-Zellen heran. Auch führt die Transplantation von Thymus einer SCID-Maus auf eine Nacktmaus zum Heranreifen normaler T-Lymphozyten. Umgekehrt führt jedoch die Transplantation von Knochenmark einer SCID-Maus in eine Nacktmaus zu keiner Bildung normaler T-

Zellen. Die Mausmodelle weisen auf die wichtige Bedeutung des Thymus als einen Ort, an dem die Heranreifung der T- Lymphozyten und Erlangung der Immunkompetenz stattfindet hin [57].

Ein klinisches Beispiel für die Bedeutung des Thymus beim Menschen ist das Di George-Syndrom. Patienten mit einem kompletten Di George-Syndrom oder thymektomierte Patienten können keine naiven T- Zellen generieren [3, 4]. Die Transplantation von Thymusgewebe kann in diesem Fall kurativ sein und die Produktion naiver T- Zellen wiederherstellen [5].

Der Thymus scheint ein spezielles und für die Heranreifung normaler T-Lymphozyten sehr wichtiges Mikromilieu zu bieten. Dabei findet eine Rekombination der Gene für die an der Zelloberfläche exprimierten T-Zellrezeptoren statt, die Zellen durchlaufen eine Umwandlung von naiven in immunkompetente T-Lymphozyten. Dazu müssen die T-Zellen lernen körpereigene von fremden Peptiden zu unterscheiden. Sie durchwandern hierfür die Prozesse der positiven und negativen Selektion. Während der positiven Selektion werden die Thymozyten auf ihre Reaktionsfähigkeit mit körpereigenen HLA- Molekülen hin geprüft. Die negative Selektion beinhaltet die Prüfung und ggf. Elimination (Apoptose) von Thymozyten, die körpereigene Eiweiße auf körpereigenem HLA-Molekülen erkennen [57].

Im Laufe dieses Reifungsprozesses exprimieren die T- Lymphozyten verschiedene Oberflächenmarker. Anfangs sind die Vorstufen der T-Lymphozyten noch als CD3-/CD4-/CD8-/CD34+ Zellen im peripheren Blut anzutreffen, um dann über CD3 Positivierung (für T-Lymphozyten) und einer Stufe der Doppelpositivität für CD4 und CD8 zu den hochspezialisierten einfach positiven CD4 oder CD8 Zellen zu gelangen.

Während der Reifung der T-Zellen im Thymus werden, wie bereits erwähnt, die Gene für den T- Zellrezeptor an der Zelloberfläche neu umgelagert (gene rearrangement); nicht benötigte Genabschnitte werden dabei ausgeschnitten. Bevor eine erfolgreiche Umlagerung des α -Lokus stattfinden kann, muss der in den α -Lokus eingestreute δ -Lokus deletiert werden. Dieser ausgeschnittene Genabschnitt lagert sich in der Folge ringförmig zusammen, ein sogenannter **T-cell-receptor Recombination Excision Circle**

(TREC), ein extrachromosomaler Ring aus DNA, entsteht (Abbildung 1). T-Lymphozyten, die kürzlich den Thymus verlassen haben, besitzen genau einen TREC-Ring pro Zelle. Die TRECs sind stabil und kommen nur in T-Lymphozyten vor. Sie werden während der Mitose nicht vervielfältigt und so mit jedem Zyklus der Zellteilung verdünnt. TRECs sind Marker für die zeitliche Nähe in der Entwicklung der T-Zellen zum Thymus. Ihre Evaluation kann unter anderem als Kriterium für die thymische Aktivität verwendet werden, reicht jedoch als alleiniger Parameter nicht aus, da bei gesteigerter zellulärer Proliferation durch den Verdünnungseffekt falsch negative Ergebnisse erwartet werden müssen.

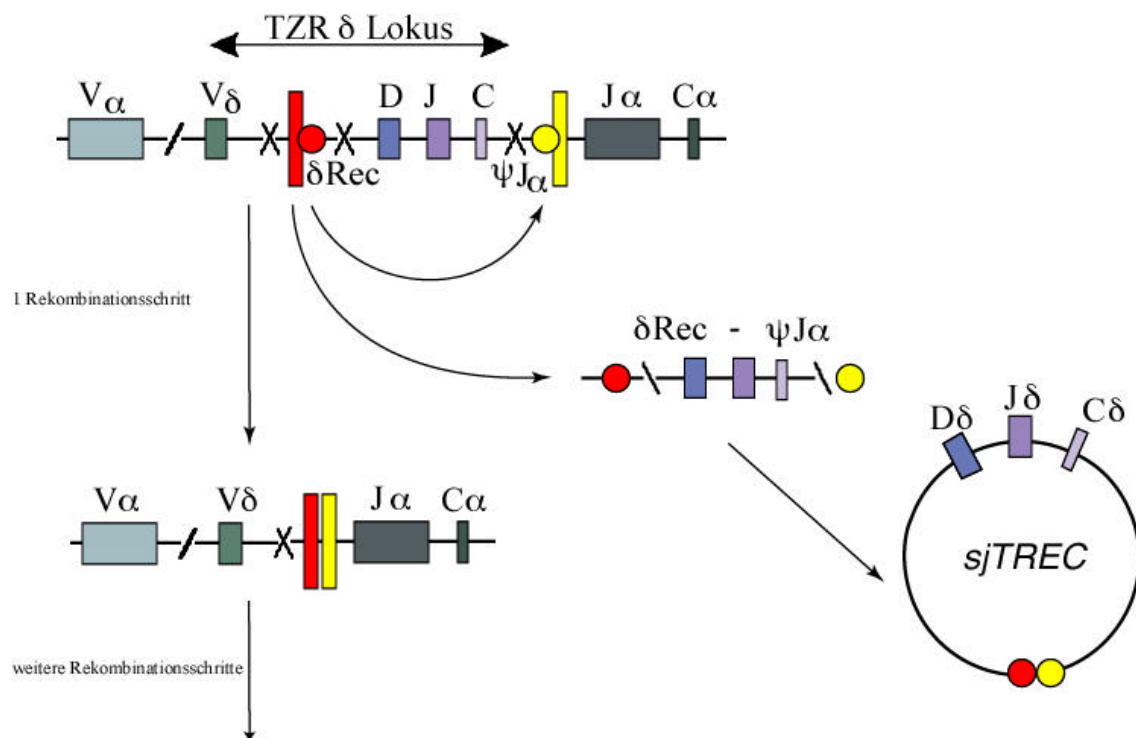


Abb. 1: Entstehung extrachromosomaler DNA-Ringe (TRECs) im Rahmen der Umschreibung der T-Zellrezeptorgene.

Ein Parameter, der eine Aussage über die Teilungsaktivität von Zellen erlaubt, ist die Messung der Expression des intrazellulären Ki67 Antigens. Ki67 stellt ein Eiweißmolekül dar, welches durch alle Phasen des Teilungszyklus der Zellen außer in G₀ exprimiert wird. Zusammen mit der TREC Analyse erlaubt nun die Kombination

dieser Methoden eine klarere Aussage über die thymische Aktivität nach Transplantation.

I.4 Ziel der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte nun der Einfluss transplantationsassoziierter Faktoren auf die thymusabhängige T- Zellrekonstitution nach Stammzelltransplantation untersucht werden. Wichtige transplantationsassoziierte Faktoren sind:

- Empfängeralter
- Art der Erkrankung
- verwendetes Konditionierungsregime
- Spender- und Transplantatart (Verwandtschaftsgrad mit dem Empfänger, HLA-Identität)
- Zahl der transplantierten Stammzellen
- Auftreten einer akuten oder chronischen GvHR.

Der zeitliche Ablauf der thymusabhängigen T-Zellregeneration in Abhängigkeit von den genannten Faktoren sollte hierbei zur Darstellung kommen. Die Kenntnis der Mechanismen der Immunrekonstitution und ihre Abhängigkeit von transplantationsassozierten Faktoren ermöglicht eine gezielte und zeitlich begrenzte Supportivtherapie bis zur Wiederherstellung der körpereigenen Abwehr. Letztere ist von besonders großer Bedeutung für das Überleben des Empfängers nach Transplantation durch den Aufbau einer funktionstüchtigen Abwehr gegen Viren und Pilze sowie eventuell noch verbliebene neoplastische Zellen.

Untersucht wurde, inwieweit nicht nur das relativ stabile Plateau der Thymusauswurfleistung, welches 12 bis 24 Monate nach Transplantation erreicht wird, sondern auch der sehr frühe Beginn der Thymusfunktion in den ersten Monaten nach Transplantation von den genannten Faktoren beeinflusst wird. Um den Verdünnungseffekt der TRECs im Rahmen der bei lymphopenischen Patienten vorhandenen homöostatischen Proliferation mit zu berücksichtigen, wurde eine Kombination des TREC-Assays mit anderen, die Neubildung von T-Lymphozyten untermauernden Evaluationsmethoden (phänotypische Charakterisierung peripherer T-Zellen sowie intrazelluläre Messung der Ki-67 Expression) angewandt. Erst die

Einbeziehung von Daten aus mehreren Methoden erlaubt eine eindeutigere Aussage über den Beitrag des Thymus zur T-Zellrekonstitution nach Transplantation hämatopoetischer Stammzellen im Kindesalter.

II. Material und Methoden

II.1 Patientendaten und Einschlusskriterien

In einem Zeitraum von Februar 2001 bis Juli 2003 wurden insgesamt 373 Proben von 164 Patienten untersucht. Die Transplantationen fanden von November 1991 bis April 2003 an der Universitätskinderklinik in Tübingen statt. 81 Patienten, die vor Mai 2001 transplantiert wurden (medianes Alter 7,3 Jahre {Streuungsbereich 0,5- 19,4}), wurden nur in der Plateauphase P ihrer Thymusfunktion (s. a. statistische Analyse) untersucht. 1 Probe pro Patient (Medianwert, Bereich 1-3) wurde in dieser Kohorte mit einer medianen Nachbeobachtungsdauer von 1507 Tagen (Bereich 320-3715) untersucht. 83 Patienten wurden nach Mai 2001 transplantiert (medianes Alter 7,5 Jahre {Bereich 0,3- 22,6}) und prospektiv zur Ermittlung von P und von T_{\min} im Verlauf untersucht. 3 Proben pro Patient (Median, Bereich 1-9) wurden in dieser Kohorte mit einer medianen Nachbeobachtungsdauer von 333 Tagen (Bereich 50- 1105) gewonnen. Mehrere Proben von einem Patienten wurden als Serienwerte, gebunden an den Patienten und nicht als unabhängige Ergebnisse, betrachtet. Die Studie erfolgte in Übereinstimmung mit den geltenden Bestimmungen der Ethikkommission der Universität Tübingen und ein schriftliches Einverständnis der Eltern wurde eingeholt. Patienten, die die ersten 100 Tage nach Transplantation nicht überlebten, fielen aus der Studie. Patienten, die eine zweite Transplantation benötigten und ein erfolgreiches Engraftment zeigten, wurden mit eingeschlossen. Die Kohorte konnte in 4 Hauptkategorien gruppiert werden: Empfänger autologer Stammzellen (n= 51), allogener Stammzellen eines HLA-identischen Geschwisteranteils (n= 47), eines nichtverwandten Fremdspenders (n = 45) oder eines haploidentischen Elternteiles (n= 21).

Tabelle 1: Patientencharakteristik (n=164)

Autologe Transplantationen	Σ n=	51
solide Tumoren		42
Leukämie/Lymphom		7
nichtmaligne Erkrankungen		2
periphere Stammzellen (>10n7/<10n7 CD34+/kg)		48(15/33)
Knochenmark		3
Konditionierung (Ganzkörperbestr./Busulfan/andere)		3/5/43
HLA identische Geschwisterspender	Σ n=	47
Leukämie/Lymphom		22
solide Tumoren (Rhabdomyosarkom)		2
myelodysplastische Syndrome		8
nichtmaligne Erkrankungen		15
periphere Stammzellen (>10n7/<10n7 CD34+/kg)		11(3/8)
Knochenmark		36
Konditionierung (Ganzkörperbestr./Busulfan/andere)		18/26/3
GvHD (akut/chronisch)		27/6
Transplantationen von unverwandten Spendern	Σ n=	45
Leukämie/Lymphom		30
myelodysplastische Syndrome		3
nichtmaligne Erkrankungen		12
periphere Stammzellen (>10n7/<10n7 CD34+/kg)		32(13/19)
Knochenmark		13
Konditionierung (Ganzkörperbestr./Busulfan/andere)		23/20/2
GvHD (akut/chronisch)		10/3
Transplantationen von elterlichen (haploidentischen) Spendern	Σ n=	21
Leukämie/Lymphom		12
solide Tumoren		1
myelodysplastische Syndrome		2
nichtmaligne Erkrankungen		6
periphere Stammzellen (>10n7/<10n7 CD34+/kg)		19(14/5)
Knochenmark		2
Konditionierung (Ganzkörperbestr./Busulfan/andere)		13/5/3
GvHD (akut/chronisch)		2/3

GvHD entspricht Graft versus Host Disease

Von den 110 Patienten, die mit Stammzellen aus dem peripheren Blut transplantiert wurden, erhielten nur 6 nichtmanipulierte Transplantate, die restlichen 104 Patienten erhielten T- Zell-depletierte Stammzellpräparate ohne anschließende Immunsuppression.

Die Konditionierung erfolgte mit Busulfan und/oder Ganzkörperbestrahlung vor allogener beziehungsweise Melphalan/Carboplatin vor autologer Transplantation. Die Patientendaten sind in Tabelle 1 aufgeführt. Die Indikationen zur Transplantation waren

in den meisten Fällen maligne Erkrankungen wie Leukämien oder Lymphome (n=62) oder solide Tumoren (n=45), 36 der 164 Patienten wurden allerdings aufgrund einer nichtmalignen Erkrankung transplantiert - siehe auch Tabelle 2.

Tabelle 2: Transplantationen wegen nichtmalignen Erkrankungen

kongenitale Granulozytendysfunktion	1
kongenitale Erythrozytendefekte	2
hämophagozytierende Lymphohistiozytose	1
metachromatische Leukodystrophie	1
X-chromosomale Adrenoleukodystrophie	3
autoimmune Erkrankungen	2
Osteopetrose	5
Polycytaemia vera	1
schwere aplastische Anämie	11
schwerer kombinierter Immundefizienz	1
Schwachmann-Diamond Syndrom	1
Sichelzellanämie	2
Thalassämie	3
Wiskott-Aldrich Syndrom	2
	Σ n= 36

II.2 Reagenzien und Geräte

T-Lymphozytenisolierung

BIOCOLL Dichtegradientenlösung- Biochrom, Berlin

PBS- DÜBELCCO, phosphatgepufferte Kochsalzlösung 0,9%, ohne Calcium und Magnesium- Biochrom, Berlin

Antikörper für Durchflusszytometrie

- Monoklonale Zelloberflächenantikörper: anti-CD3, CD4, CD8, CD27, CD45 RA, CD45 RO- Becton Dickenson, Heidelberg.
- Monoklonale intrazellulär färbende Antikörper: Ki67 FITC- Coulter- Immunotech, Krefeld

Saponin für Zellmembranpermeabilisierung- Riedel de Haen, Deisenhofen.

Reagenzien für Polymerase Ketten Reaktion (s. auch Methoden: TREC Assay)

5' Nuklease Primer- 5'- MegaBases, Chicago, USA.

TaqMan Sonde- TaqMan FAM 5'-Mega Bases, Chicago, USA.

Platinum Taq Polymerase- Invitrogen, Karlsruhe

Proteinase K- Roche, Mannheim

Glas- und Kunststoffartikel

Falcon Röhrchen á 14 ml- Becton Dickinson, Heidelberg

FACS Röhrchen (rund) á 5 ml- Becton Dickinson, Heidelberg

Sterile Pipettenspitzen á 10 µl- BIOZYM PreCision, Hess. Oldendorf

Sterile Pipettenspitzen á 100 und 1000µl- Saarestedt, Nümbrecht

Sterile Pipettenspitzen á 200 µl- Saarestedt, Nümbrecht

Sterile Pipetten á 5, 10 und 25 ml- Corning Incorporated, New York, USA

Pasteur Pipetten- WU, Mainz

Geräte

FACSCalibur, Software: CellQuest[®] (Becton Dickinson, Heidelberg)

ABI7700-Sequence Detector - (AppliedBiosystems, Weiterstadt)

Pipettboy Accu- Tecnomara, Schweiz

Vortexer- Heidolf Reax- neoLab, Heidelberg

Zentrifuge Rotixa (Hettich, Tuttlingen)

II.3 Methoden

Aufarbeitung der Proben und FACS Analyse

Die Durchflußzytometrie (**FACS- Fluorescence Activated Cell Sorting**) erlaubt eine Unterscheidung und Zählung der Zellen aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften (Größe, Granularität). Zusätzlich macht man sich die Möglichkeit der Bindung fluoreszenzmarkierter Antikörper an bestimmte Zelloberflächenantigene zunutze. Als Lichtquelle kommt ein Laserstrahl zur Verwendung. Die Zellen werden aus der Suspension angesaugt und mittels Überdruck in Richtung der Meßküvette transportiert. Dort erfasst eine laminar durch die Messkammer fließende Trägerflüssigkeit die Zellsuspension, der Probenstrom ist auf das Zentrum der Küvette gerichtet. Diese wiederum verengt sich zunehmend, so dass der Fluss in diesem Bereich eine starke

Beschleunigung erfährt. Die Beschleunigung, auch „hydrodynamische Fokussierung“ genannt, hat zur Folge, dass die Zellen den Laserstrahl am Messpunkt stets als Einzelzellen passieren. Trifft am Messpunkt der fokussierte Laserstrahl auf eine Zelle, streut diese das Laserlicht in alle Richtungen. Dabei unterscheidet man das Vorwärtsstreulicht (**Forward Scatter = FSC**), proportional zur Zellgröße und das Rechtwinkelstreulicht (**Side Scatter = SSC**), ein Maß für die Zelldichte und Granularität. Mit Hilfe dieser Streuungsparameter und der Fluoreszenzsignale, die von Photoverstärkern aufgenommen und verarbeitet werden, lassen sich die Zellen charakterisieren [50-54].

Es erfolgte die Bestimmung der prozentualen und absoluten Zahlen der einzelnen T-Lymphozytenfraktionen. Verwendet wurden die erwähnten fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörper gegen CD3, CD4 sowie CD8. Bestimmt wurde auch der Anteil an naiven (CD45RA) und Gedächtnis-(CD45RO)-T-Zellen in jeder der o.g. Subpopulationen (s. auch Tabelle 4).

Tabelle 3: Färbung mit monoklonalen Antikörpern

Röhrchen Nr.	Antikörper					FACS Messung
	FITC	PE	CyChr	APC	PerCp	
1.	Isotypenkontrolle Simultest					alle Zellen Gate 1
2.		CD3				alle Zellen Gate 1
3.	CD8	CD4		CD3		alle Zellen Gate 2
4.		IgG1 Kontrolle				alle Zellen
5.	Ki67	CD4	CD45 RA	CD3		Gate 2
6.	Ki67	CD45 RO		CD3	CD4	Gate 2
7.	Ki67	CD27	CD45 RA	CD8		Gate 2
8.	CD45 RA	CD31		CD3	CD4	Gate 2
9.	CD45 RO	CD31		CD3	CD4	Gate 2

aCD= anti CD.. Antikörper; APC/PerCP/Pe/FITC/CyChr=fluorochrome Farben

Die mit fluoreszierenden Antikörpern markierten Zellen wurden durch ein Laserlicht (488 nm) angeregt und die Emissionen bei verschiedenen Wellenlängen (FITC bei 580 nm, PE bei 650 nm, PerCp bei 682 nm, APC bei 660 nm) detektiert. Aufgenommen wurden bei jeder Messung 10.000 Zellen. Zur Auswertung der Daten wurde das Programm CellQuest verwendet. Es wurde die korrelierte Zweiparameterdarstellung oder „Dotplot“- 4 Quadrantenanalyse ausgewählt. Die Fluoreszenz einer einzelnen Zelle entspricht dabei einem Punkt auf dem Koordinatensystem, dessen x- und y-Achsen die Fluoreszenzintensität der verwendeten Farben darstellten (logarithmische Achsenskalierung). Ebenfalls wurde in einem weiteren Koordinatensystem auf der x-Achse das Vorwärtstreulicht (FSC = Zellgröße) und auf der y-Achse das Rechtswinkelstreulicht (SSC = Granularität) zur Darstellung gebracht. Zunächst wurde anhand der FSC- und SSC-Parameter ein Lymphozytengate gesetzt (G1 in Tabelle 3), um den prozentualen Anteil der Lymphozyten an den Gesamtleukozyten zu ermitteln. In einem zweiten Schritt wurden dann T-Zellen anhand ihrer SSC- und FL-3 (CD3 PerCp) Parameter markiert (G2 in Tab. 3) und gemäss der Expression von CD4, CD8, CD27, CD45RA, CD45RO die entsprechenden T-Zellsubpopulationen analysiert.

Aus EDTA-Blut wurden mittels Ficoll-hypaque Dichtegradientenzentrifugation periphere mononukleäre Zellen isoliert. Dabei wird 1:1 mit isotoner Kochsalzlösung (PBS) verdünntes Vollblut über die Ficolllösung geschichtet und anschließend zentrifugiert. Es entsteht ein Gradient, der die Aufteilung nach Größe und Gewicht der Zellen erlaubt. Das zu gleichen Anteilen mit PBS verdünnte EDTA-Blut, wurde in mit 2 ml Ficoll-hypaque Lösung gefüllte Falcon- Röhren vorsichtig aufgeschichtet. Nach Zentrifugation mit 800 g (relative Zentrifugalkraft) bei Raumtemperatur über 15 Minuten und langsamer Abbremsung wurden die mononukleären Zellen in der Interphase gesammelt und zweimal in PBS gewaschen. Nach dem zweiten Waschgang wurde der Überstand vollständig abgesaugt und das trockene Pellet bei -80°C bis zur späteren TREC-Analyse eingefroren. Vor dem Einfrieren wurde ein Aliquot zur Bestimmung der Gesamtzellzahl sowie zur durchflusszytometrischen Bestimmung des Anteiles der CD3 positiven Zellen entnommen, um die in der Probe vorhandene T-Zellzahl exakt zu definieren.

Als Ausdruck zellulärer Proliferation wurde in 141 Proben von 81 verschiedenen Patienten parallel dazu auch die spontane intrazelluläre Ki67-Expression in frisch separierten naiven und Gedächtnis-CD4⁺ und CD8⁺ Zellen innerhalb von 12 h nach Entnahme der Blutprobe gemessen (s. auch Tab.4). Der TREC- Gehalt peripherer T-Zellen wird nicht nur durch die Thymusproduktion beeinflusst, sondern auch durch die Proliferationsrate naiver T- Zellen und der damit verbundenen Dilution der TRECs. Erst die kombinierte Auswertung von T-Zellzahl, Proliferationsrate und TREC- Analyse unter Berücksichtigung klinischer Daten erlaubte eine Aussage über die tatsächliche Thymusfunktion [18,19]. Zur Messung der Ki67-Expression wurden nach der oben beschriebenen Oberflächenfärbung die Zellen mit 4%iger Paraformaldehydlösung fixiert und die Zellwände durch Inkubation mit 0,3%igem Saponin über 15 Minuten bei Raumtemperatur permeabilisiert. Anschließend erfolgte die intrazelluläre Anfärbung mit 5 µl FITC- konjugiertem monoklonalen Ki67-Antikörper über 10 Minuten bei Raumtemperatur gefolgt von zwei Waschgängen in 0,1%iger Saponinlösung. Die Messung erfolgte analog der oben beschriebenen Oberflächenmarkeranalyse auf einem FACSCalibur mit Hilfe der CellQuest[®] Software (BD, Heidelberg).

TREC-Assay

Es handelt sich hierbei um eine quantitative RealTime PCR Methode, die kürzlich von Douek et al. beschrieben worden ist [4,9,11]. Die isolierten und bei -80°C eingefrorenen Zellpellets wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und mit 100 µl/ml Proteinase K in einem Verhältnis von 10 µl auf 10⁵ Zellen zunächst 1 Stunde bei 56°C und dann 15 Minuten bei 95°C inkubiert. Es folgte die RealTime PCR mit 5 µl des Zelllysats (entsprechend 50.000 Zellen) und folgenden Primern: 5'-CACATCCCTTTCAACCATGCT-3' und 5'-GCCAGCTGCAGGGTTTAGG-3' sowie der TaqMan Sonde 5'-FAM-ACACCTCTGGTTTTTGTAAGGTGCCCACT-TAMRA-3'. Die PCR Reaktion enthielt 0,5 U Platinum Taq Polymerase und 3,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 500 nM von jedem Primer und 200 nM Sonde in einem Endvolumen von 25 µl. Die PCR-Bedingungen waren: Start mit 95°C für 5 Minuten, danach 40 Zyklen mit 95°C Denaturierung für 30 Sekunden und 60°C Annealing und Elongation für 1 Minute. Jeder Assay enthielt 6 interne Standards mit 10²-10⁷ TREC-Molekülen, die freundlicherweise von Herrn Dr. Douek, NIH, Bethesda, USA zur

Verfügung gestellt worden waren. Anhand dieser Werte wurde eine Standardkurve erstellt, aus der mit Hilfe der ABI7700 Sequenzdetektor-Software (Applied Biosystems, Weiterstadt) der TREC-Gehalt der Proben bestimmt werden konnte. Alle Proben und Standards wurden dreifach gemessen.

Statistik

Um die statistischen Zusammenhänge besser darzustellen, werden die weiter unten im Detail gezeigten Ergebnisse kurz umrissen. Alle Patienten, die in der frühen Phase nach Transplantation analysiert wurden, hatten mindestens eine TREC⁻ Probe. Aufgrund dieser Beobachtung und des Verlaufes der TREC-Werte in Abbildung 2 konnten wir folgendes Modell der Rekonstitution TREC⁺ T-Zellen annehmen: nach einer frühen Phase ohne nachweisbare TREC⁺ T-Zellen im peripheren Blut beginnen die Patienten zum Zeitpunkt T_{\min} innerhalb des ersten Jahres nach Transplantation TREC⁺ Zellen zu entwickeln. Ungefähr 18-24 Monaten nach Transplantation wird dann ein stabiles Plateau P an TREC⁺ Zellen erreicht. Ist dieses Plateau P erreicht, halten sich die thymusabhängige T-Zellneogenese und die Clearance der TREC⁺ T-Zellen aus dem peripheren Blut die Waage.

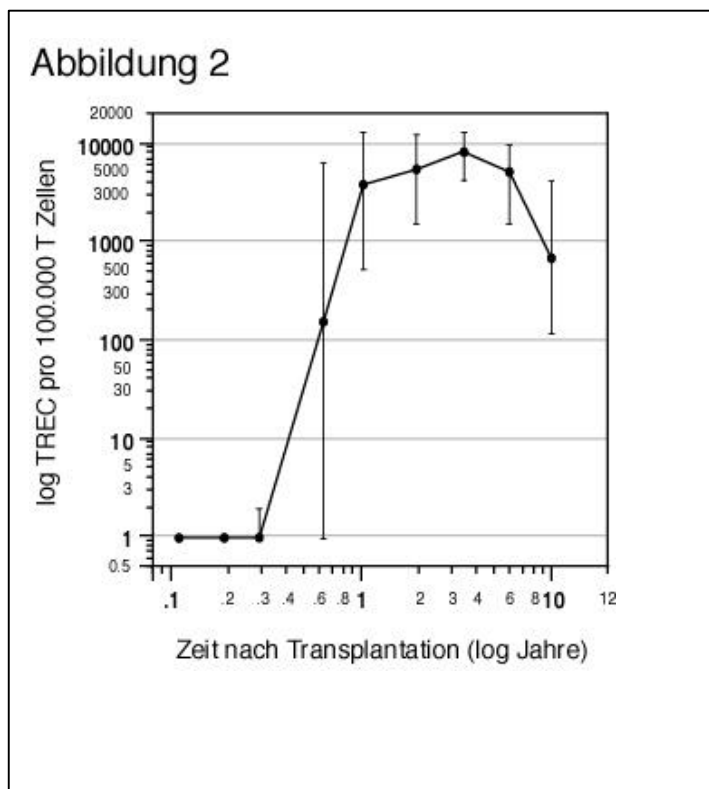


Abb. 2: TREC Gehalt peripherer T-Zellen nach Stammzelltransplantation

In der frühen Phase nach Transplantation sind keine TRECs vorhanden, beginnen aber ab einem Zeitpunkt T_{\min} zu steigen. Nach ca. 1-2 Jahren erreichen die TRECs ein stabiles Plateau P , welches bis zu 10 Jahren unverändert stabil bleibt. Die TREC Daten sind nach logarithmischer Transformation gegen die Zeit nach Transplantation dargestellt. Die Ergebnisse sind als Medianen gezeigt, die Fehlerbalken stellen die 25. und 75. Perzentile dar.

Für den Parameter T_{\min} wurde eine lognormale Verteilung angenommen, dessen Median linear vom Alter abhängig ist. Diese Annahme basiert auf einer initialen Analyse, in der, nach Gruppierung in altersabhängige Quartile, eine lineare Beziehung zwischen dem Patientenalter und T_{\min} gefunden werden konnte. Eine Intervallzensierung der Daten berücksichtigte fehlende Einzelwerte (z.B. wurden 81 Patienten nur in der Plateauphase P analysiert).

Die untersuchten Parameter wurden gemäss eines Maximum-likelihood Modells angegeben. Der Einfluss folgender Variablen auf den Zeitpunkt T_{\min} der Regeneration TREC⁺ T- Zellen wurde analysiert: Art des Transplantates (autologe Stammzellen, bzw. Stammzellen eines HLA-identischen Geschwisterkindes oder eines unverwandten oder haploidenten Spenders), Art der Erkrankung (maligne bzw. nichtmaligne), Stammzellherkunft (peripheres Blut oder Knochenmark), Anzahl der transplantierten CD34⁺ Stammzellen (< oder > 10^7 CD34⁺/kg Körpergewicht), verwendetes Konditionierungsregime (Ganzkörperbestrahlung, Busulfan oder andere) sowie Auftreten von GvHD (akut oder chronisch).

Da in der Folge nur das Alter und die akute GvHD einen signifikanten Effekt auf T_{\min} zeigten, wurden beide Faktoren gleichzeitig in einem multifaktoriellen Maximum-likelihood Modell auf ihre Signifikanz hin überprüft. Das Plateau P der 101 Patienten, die TREC⁺ T-Zellen entwickelten, wurde aufgrund des geometrischen Mittelwertes errechnet und zwischen den verschiedenen Untergruppen mittels Einweg-ANOVA verglichen. Um eine vergleichbare Varianzen zwischen den einzelnen Gruppen zu erreichen, wurden die Daten vor der Analyse logarithmisch transformiert.

In Annahme einer unteren Nachweisgrenze von 0,1% wurde die Ki67-Expression vor und nach Tag 180 unter Verwendung eines begrenzten Maximum-likelihood Modelles miteinander verglichen. Zensierte Einzelwerte unterhalb der Nachweisgrenze wurden mitberücksichtigt. Der logit-Wert ist dabei definiert als der Logarithmus des Bruchwertes aus: Prozentsatz der Expression geteilt durch eins minus den Prozentsatz der Expression.

Die unterschiedliche Anzahl der Proben pro Patient wurde berücksichtigt, indem die Patientenzahl als Zufallsfaktor miteinbezogen wurde. Die Ki67-Expression wurde mit

den peripheren CD3⁺ T-Zellzahlen korreliert und innerhalb der fünf untersuchten T-Zellsubpopulationen miteinander verglichen. Die P-Werte wurden nach der Bonferroni-Holm Methode der Zahl der innerhalb des Datensatzes getesteten Hypothesen angepasst.

III. Ergebnisse

III.1 TREC-Gehalt, absolute TRECs und Anzahl naiver T-Zellen

Die Ergebnisse der TREC- Analysen wurden als absolute Anzahl der TREC⁺ T- Zellen pro µl peripherem Blut sowie als TREC⁺ T-Zellen pro 100.000 T-Zellen errechnet. Die Daten der TREC⁺ T-Zellen pro µl zeigten eine starke positive Korrelation mit den Zahlen der naiven CD4⁺ T-Zellen (Abbildung 3A), naiven CD8⁺ T-Zellen (Abbildung 3B), als auch mit der Gesamtsumme der naiven CD3⁺ T-Zellen (Abbildung 3C). Ähnliche Ergebnisse fanden sich für die Korrelation der TREC⁺ T-Zellen pro 100.000 T-Zellen und der Anzahl der naiven T-Zellen. Demzufolge kann unter normalen Bedingungen die Anzahl der naiven T-Zellen zur Abschätzung der TRECs verwendet werden.

Weiterhin wurde eine starke positive Korrelation zwischen der Anzahl der TREC⁺ T-Zellen pro µl Blut und der Anzahl TREC⁺ T-Zellen pro 100.000 T-Zellen (Abbildung 3D) gefunden. Dies bedeutet, dass beide Parameter gleichermaßen zur Darstellung der Thymusfunktion verwendet werden können.

Abbildung 3

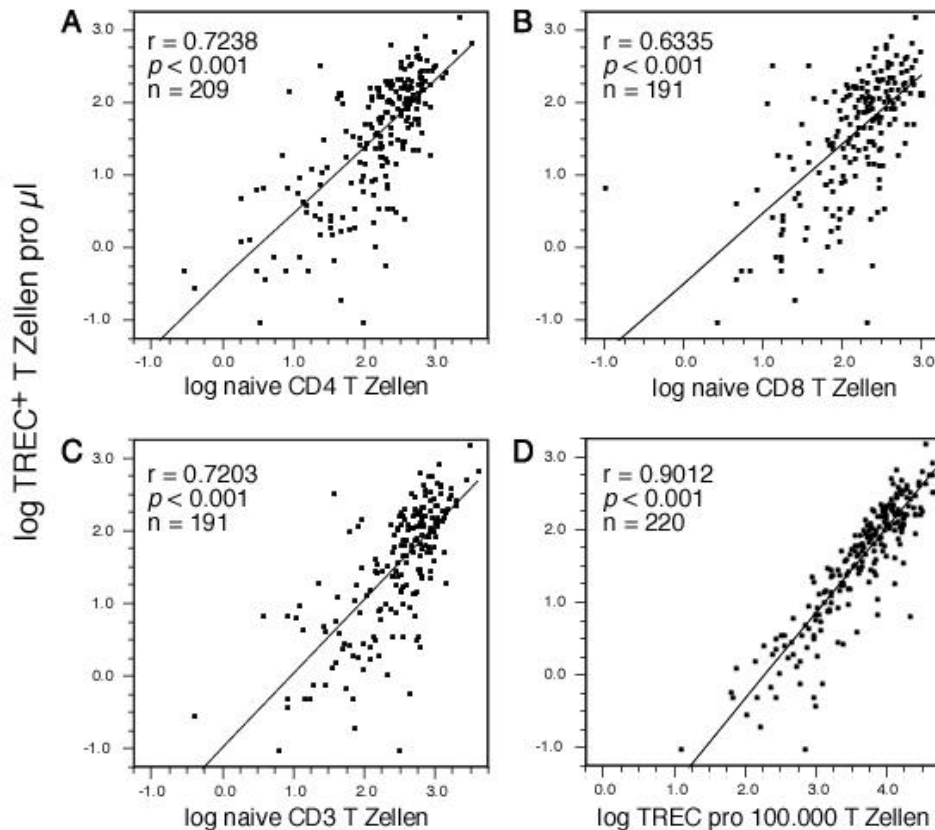


Abb. 3: Korrelation der TRECs mit den naiven T-Zellpopulationen

Nach logarithmischer Transformation korrelierte der TREC-Gehalt peripherer T-Zellen mit der Zahl der naiven CD4⁺ (A), naiven CD8⁺ (B) sowie mit der totalen Zahl naiver CD3⁺ T-Zellen. Desweiteren korrelierte der TREC-Gehalt peripherer T-Zellen, angegeben als *TREC pro 100.000 T-Zellen*, gut mit der errechneten Zahl der *TREC⁺ T-Zellen pro μ l* (D). Diese Ergebnisse zeigen, daß beide Parameter äquivalent verwendet werden können. *n* zeigt die Zahl der untersuchten Proben an.

III.2 Intrazelluläre Ki67-Expression in peripheren T-Zellen

Die spontane Ki67-Expression in peripheren T-Zellen vor dem Tag 180 nach Transplantation war signifikant höher (Mittelwert 1,8 %; 95 % CI 1,33 –2,54 %) als nach Tag 180 (Mittelwert 0,83 %, 95 % CI 0,68- 1,03 %). In einer Untergruppenanalyse konnte diese Abnahme der Ki67-Expression allerdings nur für naive CD4⁺, Gedächtnis-CD4⁺ und Gedächtnis-CD8⁺ T-Zellen bestätigt werden.

Die Ki67-Expression war zwischen allen sechs möglichen Kombinationen von naiven und Gedächtnis CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen positiv korreliert (Korrelationskoeffizienten zwischen 0,29 und 0,46), was zeigt, dass die Proliferation in diesen Populationen von einem gemeinsamen Faktor abhängig zu sein scheint. Interessanterweise zeigte die Ki67-Expression in naiven und Gedächtnis-CD4⁺ und CD8⁺ T- Zellen eine inverse

Korrelation zur Gesamt-T-Zellzahl (Korrelationskoeffizienten zwischen $-0,28$ und $-0,38$). Dies könnte ein Hinweis dafür sein, dass die spontane Proliferation dieser Populationen in der frühen Phase nach Transplantation durch Homöostasemechanismen unterhalten wird. Die Durchführung einer T-Zelldepletion oder das Auftreten einer GvHD hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Ki67-Expression in $CD4^+$ und $CD8^+$ Gedächtnis- und $CD8^+$ Effektorpopulationen. Naive $CD8^+$, jedoch nicht naive $CD4^+$ T-Zellen von Patienten mit einer akuten GvHD nach Knochenmarktransplantation zeigten eine signifikant niedrigere Ki67-Expression (Mittelwert $0,3\%$, 95% CI $0,8 - 2,3\%$ versus $1,4\%$, 95% CI $0,1 - 0,7\%$ in Patienten mit versus ohne GvHD, $p=0,0141$). Dieses Phänomen konnte bei Empfängern von T-Zell-depletierten peripheren Stammzellen (Abb. 4A und B) nicht beobachtet werden. Im Gegensatz dazu zeigte die Ki67-Expression in Effektor- $CD8^+$ T-Zellen keine Korrelation zu einem der analysierten Parametern. Dies lässt den Schluss zu, dass die Proliferation der Effektor- $CD8^+$ T-Zellen von Faktoren unterhalten wird, die nicht in dieser Studie erfasst worden sind.

Abbildung 4

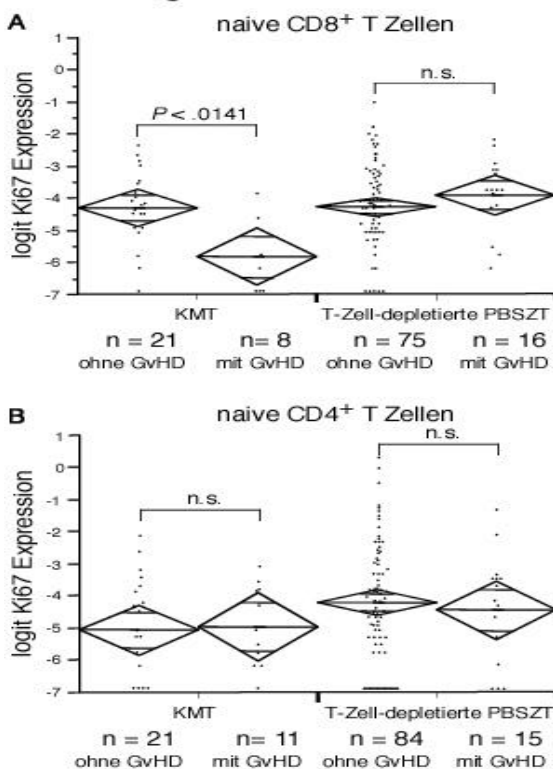


Abb. 4: Akute GvHD senkt die Ki67-Expression in naiven $CD8^+$ T-Zellen

Eine akute GvHD (Grad 2-4) resultiert in einer erniedrigten Ki67-Expression in naiven $CD8^+$ T-Zellen nach Transplantation von Knochenmark eines HLA-identischen Geschwisterkindes. Nach Transplantation T-Zell depletierter peripherer Stammzellen konnte dies allerdings nicht beobachtet werden (A). Ferner wurde kein Einfluß einer akuten oder chronischen GvHD auf die Ki67 Expression in naiven $CD4^+$ (B) als auch in Gedächtnis $CD4^+$, Gedächtnis $CD8^+$ und CTL $CD8^+$ T-Zellen beobachtet (Daten nicht angezeigt). Die Ergebnisse wurden mittels unidirektionaler ANOVA analysiert. Die Rauten repräsentieren den Mittelwert \pm das 95%-Konfidenzintervall, n zeigt die Zahl der untersuchten Proben an.

III.3 Einflussfaktoren für den Beginn der Thymusaktivität T_{\min}

Der Beginn der Thymusaktivität wurde definiert als der Zeitpunkt T_{\min} , an dem sich bei den Patienten erstmals nach Transplantation $TREC^+$ T-Zellen im peripheren Blut nachweisen ließen. In einem ersten Analyseschritt erfolgte die Aufteilung der Patientenkohorte in 4 Altersquartile und die Berechnung einer Korrelation zwischen Patientenalter und T_{\min} . Mit Hilfe dieses Modelles konnten wir berechnen, dass die mittlere Zeit bis zur ersten Detektion $TREC^+$ T-Zellen bei Kindern, die zum Zeitpunkt der Transplantation unter einem Jahr alt waren, 83 Tage betrug. Jedes weitere Lebensjahr verlängerte diese Frist um 14 Tage. Dieses Modell des altersgebundenen Beginns der Thymusfunktion konnte auch in der Analyse des Einflusses verschiedener transplantationsrelevanter Faktoren (Art des Transplantates, Spenders, Erkrankung, Konditionierung, Auftreten von GvHD, Zahl der transplantierten Zellen/kg KG) auf den Zeitpunkt T_{\min} bestätigt werden. Allerdings konnte diese altersabhängige Berechnung in den Untergruppen unmanipulierte periphere Stammzellen, Patienten mit chronischer GvHD und nichtmaligne Erkrankungen nicht durchgeführt werden, da die Patientenzahlen diesen Gruppen hierfür zu klein waren. Die mittlere Zeit zum Erreichen positiver TREC-Werte war deutlich kürzer bei Patienten, die wegen einer nichtmalignen Erkrankung transplantiert wurden (Median 206 Tage vs. 148 Tage bei Patienten mit malignen vs. nichtmalignen Erkrankungen). Wegen der ungleichmäßigen Verteilung der Patienten in diesen beiden Gruppen ($n = 128$ vs. $n = 36$) erreichte dieser Unterschied jedoch keine statistische Signifikanz $P = 0,21$ (Tabelle 3). Die Art des Transplantates, des Spenders, des Konditionierungsregimes und die transplantierte Zellzahl hatten keinen Einfluss auf den Beginn der Thymusaktivität. Es gab keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen autologen und allogenen Transplantationen bezüglich T_{\min} . Im Gegensatz zu den vorteilhaften Effekten des jüngeren Alters und der nichtmalignen Erkrankung führten die akute (Grad 2-4) bzw. die chronische GvHD (begrenzte und extensive Form) zu einer Verzögerung von T_{\min} um 151 Tage (Median, $P = 0,036$) bzw. 184 Tagen (Median, $P = 0,16$). Durch Einbeziehung sowohl des Alter als auch der akuten GvHD in ein multifaktorielles Modell für T_{\min} , konnten wir zeigen, dass allein das Alter einen signifikanten Einfluss auf T_{\min} hat. Obwohl die akute GvHD den Beginn der Wiederherstellung der Thymusfunktion um 149 Tage verzögerte

(Mittelwert, 95 % CI -2 - 378 Tage), war dieser Effekt nicht signifikant, da die Grenze des 95 % Konfidenzintervalles Null unterschritt.

Tabelle 3: Faktoren, die den Beginn von T min und Plateau P der Thymusaktivität beeinflussen

Variable	mittlerer Beginn (Tage)	Signifikanz	Plateau TRECs (TREC per 10n5Zellen)	Signifikanz
Altersverteilung [≤3,7 3,8-7,3 7,4-12,4 ≥12,6]	109 vs. 166 vs. 216 vs. 298	p< 0,002	5378 vs. 5765 vs. 3139 vs. 3047	ns
Zellzahl [<10n7 vs. >10n7 CD34+/kg]	83 vs. 64	ns	3268 vs. 8878	P=0,0011
Transplantat* [KM vs. TZd-SZ vs. SZ]	164 vs. 204 vs. 375	ns	3239 vs. 5107 vs. 6119	ns
Spender [HLA ident. Geschwister vs. unverwandt vs. von Eltern vs. autolog]	101 vs. 57 vs. 103 vs. 98	ns	3050 vs. 3002 vs. 7388 vs. 6599	ns
Konditionierung [GKB vs. Busulfan vs. andere]	91 vs. 5 vs. 107	ns	3056 vs. 3785 vs. 6812	ns
Akute GvHD [keine GvHD vs. akute GvHD Grad 2-4]	74 vs. 174	p<0,001	5102 vs. 2707	p=0,0395
chronische GvHD [keine GvHD vs. chronische GvHD- limitiert und extendiert]	186 vs. 408	p<0,001	4628 vs. 1381	p=0,0359
Erkrankung [maligne vs. nicht maligne]	222 vs. 81	p<0,001	3996 vs. 5235	ns

ns= nicht signifikant;
SZ= Stammzellen

KM= Knochenmark;

TZd-SZ= T Zell deplettierte Stammzellen

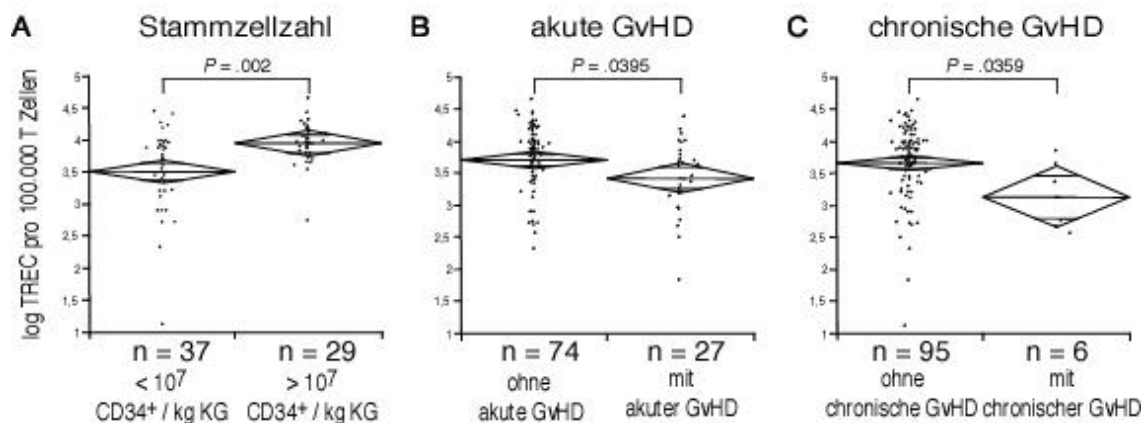
GKB= Ganzkörperbestrahlung

GvHD= Graft versus Host Disease

III.4 Einflussfaktoren auf das Plateau P der Thymusfunktion

Nach dem initialen Anstieg der TREC- Werte erreichten die Patienten nach 18- 24 Monaten ein Plateau P , auf dem die TREC- Werte über längere Zeit konstant blieben (Abbildung 2). Dieses Plateau P wurde als zweiter Parameter, der die Thymusfunktion in einer stabileren Phase beschreibt, definiert und der Einfluss der oben erwähnten Variablen auf die Höhe von P analysiert. Interessanterweise übte als einzige Variable allein die transplantierte Zellzahl einen positiven Effekt auf P aus. Patienten, die mehr als 10^7 CD34⁺ hämatopoetische Stammzellen/kg KG erhielten, hatten signifikant höhere TREC-Werte in der Plateauphase, als diejenigen, die weniger Stammzellen erhalten hatten (im Median 8878 vs. 3268 TRECs/100.000 T- Zellen in Patienten mit höheren vs. niedrigeren Stammzellzahlen, $P = 0,002$; Abb. 5A). Alle anderen analysierten Faktoren, einschließlich Alter und Erkrankungstyp, zeigten keinen förderlichen Effekt auf die Thymusfunktion. Es konnte für P kein Unterschied zwischen autologen oder allogenen Transplantationen festgestellt werden. Wie in der oben erwähnten Analyse für T_{\min} , fanden wir mittels einer Einweg-ANOVA, dass das Auftreten sowohl einer akuten, als auch einer chronischen GvHD zu einer signifikanten Verschlechterung der Thymusfunktion mit niedrigeren TREC-Werten in der Plateauphase P führt (im Median 2707 versus 5102 TRECs/100.000 T-Zellen bei Patienten mit versus ohne akute GvHD, $P = 0,0395$ sowie 1381 versus 4628 bei Patienten mit versus ohne chronische GvHD, $P = 0,0359$; Abbildung 5B und C). Die Durchführung einer Multivariatanalyse ergab jedoch, dass allein die Zelldosis ($> 10^7$ CD34⁺ Stammzellen/kg KG) mit signifikant höheren TREC-Werten in der Plateauphase P verbunden ist ($P = 0,0022$).

Abbildung 5

**Abb. 5: Einfluß der transplantierten Zellzahl und einer GvHD auf *P***

Patienten, die mehr als 10^7 CD34⁺ Zellen/kg Körpergewicht erhalten hatten, weisen signifikant höhere TREC-Werte in der Plateauphase *P* der thymischen Rekonstitution auf (A). Jüngerer Alter und eine nichtmaligne Erkrankung, die zu einer schnelleren Wiederherstellung der Thymusfunktion führen, beeinflussen den TREC-Gehalt peripherer T-Zellen in dieser Phase nicht. Allerdings kann eine akute (B) und chronische GvHD (C) den TREC-Gehalt peripherer T-Zellen erniedrigen, wohingegen andere transplantations-assoziierte Faktoren wie das Konditionierungsregime, die Art des Spenders oder des Transplantates keinen Einfluss haben (diese Daten sind nicht gezeigt). Die Ergebnisse wurden mittels unidirektionaler ANOVA analysiert. In einer Multivariatanalyse konnte jedoch nur die transplantierte Stammzellzahl als signifikanter Einflussfaktor auf die Thymusauswurfleistung in der Plateauphase *P* identifiziert werden ($P = 0,0022$)

IV. Diskussion

Bedingt durch die vor einer Transplantation notwendige intensive Radiochemotherapie und die damit verbundene Zerstörung der körpereigenen Abwehrkräfte, befindet sich der Empfänger bis zur Regeneration eines neuen Immunsystems in einem Zustand der funktionellen Abwehrschwäche. Trotzdem wird der Organismus in dieser Phase mit zahlreichen Erregern konfrontiert und benötigt daher bis zur Regeneration des Immunsystems besondere medizinische Überwachung und Behandlung. Im Gegensatz zu früheren Annahmen scheint die Wiederherstellung des Immunsystems, ein wichtiger Teil dessen die T-Zellen sind, bereits sehr früh nach Transplantation einzusetzen. Insbesondere Kinder zeigen eine erstaunliche Kapazität zur raschen Regeneration naiver, im Thymus des Empfängers herangereifter T-Zellen. In der letzten Zeit häufen sich Anhaltspunkte dafür, dass auch beim Erwachsenen eine gewisse persistierende Aktivität des Thymus festzustellen und daher auch in dieser Altersgruppe nach

Stammzelltransplantation eine Regeneration naiver T- Zellen möglich ist [1-3]. Obwohl der Thymus zweifellos vor Beginn der Pubertät seine größte Aktivität besitzt, gibt es weltweit keine Studien, die die Thymusfunktion bei Kindern nach Stammzelltransplantation systematisch untersucht haben.

Zur Interpretation der Daten der TREC- Analyse sind jedoch zusätzliche Angaben über das Proliferationsverhalten peripherer T-Zellen notwendig. Wie bereits erwähnt, kommt es nach einer Transplantation konditionierungsbedingt zur Ablation des körpereigenen Immunsystems. In den ersten 6 Monaten nach Stammzelltransplantation besteht die Vermehrung der T-Lymphozyten insbesondere in Antigen-getriggelter Aktivierung und Proliferation transplantierte, reifer T-Zellen [58]. Generell hat der Organismus die Tendenz, in dieser Situation der absoluten Lymphopenie durch rasche, spontane Teilung der vorhandenen T-Zellen den peripheren T-Zellpool "aufzufüllen", ein Phänomen, welches man auch homöostatische Proliferation nennt [31]. Das Auftreten von $CD3^+CD4^+CD45RA^+$ Zellen sowie Anstieg $TREC^+$ Zellen im peripheren Blut kann für eine beginnende T-Zellneubildung sprechen. Werden die TREC- Werte oder die Zahlen peripherer naiver T- Zellen isoliert betrachtet, kann es zu einer deutlichen zeitlichen und quantitativen Unterschätzung der Thymusfunktion kommen, da die hohen Teilungsraten aller T-Zellen in dieser frühen Regenerationsphase zu einem Verlust der TREC- Ringe bzw. zu einem raschen Phänotypwechsel führen können [31].

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Thymusfunktion und T-Zelldynamik in einer rein pädiatrischen Patientenkohorte nach autologer und allogener Stammzelltransplantation zu untersuchen. Obwohl der TREC-Assay ein sehr wichtiges diagnostisches Mittel für das Immunmonitoring darstellt, konnte in früheren Arbeiten bereits klar gezeigt werden, dass die Interpretation von TREC- Daten durch die schnelle Clearance $TREC^+$ T-Zellen aus dem peripheren Blut oder durch die Langlebigkeit von $TREC^+$ naiven T- Zellen in der Ruhephase bedeutend verfälscht werden kann [18, 19]. Demzufolge müssen in klinischen Situationen, in denen sich der periphere T- Zellpool nicht in „steady state“ Bedingungen befindet, Angaben zum T-Zellumsatz zur korrekten Interpretation der TREC- Daten herangezogen werden. Durch die Kombination der TREC- Quantifizierung in peripheren mononukleären Zellen mit der

durchflusszytometrischen Typisierung peripherer T-Zellen sowie der simultanen Messung der intrazellulären Ki67-Expression konnte umfangreiches Datenmaterial gesammelt werden, welches eine Reinterpretation der T-Zelldynamik nach Stammzelltransplantation im Kindesalter erlaubt.

Die frühe Periode der Immunrestitution nach Stammzelltransplantation ist durch eine hohe Rate spontaner Zellteilungen charakterisiert, was durch die hohe intrazelluläre Ki67-Expression während dieser Zeit gezeigt werden konnte [13]. Ki67 ist ein nukleäres Antigen, welches in allen Phasen des Zellzyklus außer in G0 exprimiert wird und dessen Expression mit der T- Zellproliferation im Thymidineinbauassay korreliert [29]. Die Expression von Ki67 war in naiven und Gedächtnis-CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen vergleichbar und korrelierte gut zwischen allen T-Zelluntergruppen. In Anbetracht dessen kann man davon ausgehen, dass ein gemeinsamer Faktor die Proliferation in allen T- Zelluntergruppen der frühen Phase nach Stammzelltransplantation unterhält. Der einzige Parameter, der mit der Ki67-Expression in allen T- Zelluntergruppen (ausgenommen den Effektor-CD8⁺ T- Zellen) invers korrelierte, war die Gesamtzahl der peripheren CD3⁺ T-Zellen. Diese Beobachtung unterstützt stark die Vorstellung, dass die Lymphopenie an sich die Hauptantriebskraft für die homöostatische Proliferation von T-Zellen im Rahmen der Immunrestitution nach Stammzelltransplantation darstellt [30, 31]. Im Gegensatz zur Arbeit von Hazenberg et al. [13], in der nur die GvHD und Infektionen als Triebfedern der T- Zellproliferation festgestellt wurden, konnten wir die inverse Korrelation zwischen Ki67-Expression und peripheren T-Zellzahlen zeigen. Ferner fanden wir, dass Kinder, die an einer akuten GvHD erkrankt waren eine signifikant reduzierte Ki67-Expression in naiven CD8⁺ T-Zellen aufwiesen. Auch in Gedächtnis-CD4⁺ und CD8⁺ sowie in Effektor-CD8⁺ T- Zellen war die Tendenz zu einer niedrigeren Ki67-Expression festzustellen, obwohl dies keine statistische Signifikanz erreichte. Die Diskrepanz dieser Ergebnisse könnte durch das unterschiedliche Alter der Patientengruppen erklärt werden oder aber durch unterschiedliche Phasen der GvHD, die untersucht wurden. In einer erst kürzlich veröffentlichten Arbeit von Poulin et al. [32] konnte gezeigt werden, dass eine chronische GvHD die homöostatische Proliferation naiver T-Zellen nach Transplantation zulässt, jedoch die Expression der IL-7R α Kette und des

antiapoptotischen Proteins Bcl-2 in naiven T-Zellen reduziert und auf diese Weise die Überlebensdauer dieser Zellen verringert. Diese Ergebnisse zeigen, dass nicht nur der Export von T-Zellen aus dem Thymus, sondern auch periphere Ereignisse den TREC-Gehalt peripherer T-Zellen in der frühen Phase nach Transplantation signifikant beeinflussen.

Bei der Analyse des TREC- Gehaltes peripherer T-Zellen nach Stammzelltransplantation (Abbildung 2) unterschieden wir zwei Phasen der TREC- Rekonstitution. In der ersten zeigte sich ein Umschalten von TREC Negativität (dieses Phänomen war bei allen untersuchten Patienten nachweisbar) zu einem andauernden Nachweis von TRECs zum Zeitpunkt T_{\min} . In der zweiten Phase stellte sich ein Plateau P der TREC- Werte ein, welches in der Regel nach 18 bis 24 Monaten erreicht wurde. Diese beiden Etappen wurden durch verschiedene transplantationsassoziierte Faktoren beeinflusst. T_{\min} zeigte eine starke Abhängigkeit vom Alter der Patienten, auch in dieser pädiatrischen Kohorte vor Beginn der Pubertät. Bei einem einjährigen Kind können TRECs bereits im Mittel nach $2\frac{1}{2}$ Monaten nachgewiesen werden. Jedes weitere Lebensjahr verzögert das Erscheinen von TRECs nach Transplantation um 2 Wochen. Mit Sicherheit unterschätzen diese Berechnungen die Geschwindigkeit der thymischen Rekonstitution, da- wie weiter oben bereits erwähnt- $TREC^+$ T-Zellen kurzlebig sein können oder sich in dieser frühen Phase der Immunrekonstitution rasch teilen, sodass TRECs durch die erhöhte Clearance nicht mehr nachzuweisen sind. Diese Untersuchungen zeigen jedoch, dass der Beginn der Wiederherstellung der Thymusfunktion sehr viel früher erfolgt als bis vor kurzem angenommen. Ausgehend vom frühestmöglichen Nachweis phänotypisch naiver T-Zellen im peripheren Blut wurde postuliert, dass die Wiederherstellung der Thymusfunktion nicht vor dem sechsten Monat nach Stammzelltransplantation erfolgt [34, 35]. Der hier nachgewiesene, frühere Beginn der thymischen T-Zellproduktion bedeutet, dass T-Zellen mit neuen Antigenespezifitäten den peripheren T- Zellpool früher als bisher angenommen besiedeln. Demzufolge könnte eine Impfung mit T-Zell-abhängigen Vakzinen bereits zu Beginn des dritten Monats nach Transplantation erfolgreich sein, was momentan in einer Studie von C. Cordonnier (EBMT Arbeitsgruppe für Infektionskrankheiten) untersucht wird. Ein ähnlich positiver Effekt auf T_{\min} wurde bei Kindern gefunden, die wegen einer nichtmalignen Erkrankung

transplantiert worden waren. Auch wenn dieser Effekt aufgrund einer ungleichen Patientenverteilung in den Gruppen keine statistische Signifikanz erreichte, müssen wir den beobachteten Unterschied von 58 Tagen als klinisch relevant einstufen. Alle anderen untersuchten Parameter zeigten keinen Einfluss auf den Beginn der Thymusfunktion.

Im Gegensatz zu T_{\min} wurde die Plateauphase P nur durch die Dosis der transplantierten $CD34^+$ Zellen beeinflusst und nicht durch das Alter der Patienten, den Erkrankungsmodus oder die Konditionierung. In dieser Phase der Immunrekonstitution können die TREC- Werte wirklich zur Bewertung der Thymusfunktion herangezogen werden, da die initial gesteigerte T-Zellproliferation zu diesem Zeitpunkt auf ihren Ausgangswert zurückgegangen ist und das abnorme Bcl-2/Bax Verhältnisse, welches für die gesteigerte Apoptoseneigung regenerierender T-Zellen verantwortlich gemacht werden kann, sich 2 Jahre nach Transplantation wieder normalisiert hat [36]. Bis dato ist die klinische Relevanz der gesteigerten thymischen Auswurfleistung bei diesen Patienten unklar. Akute und chronische GvHD haben einen negativen Einfluss auf die Thymusfunktion, auf T_{\min} sowie auf P . Diese Beobachtung ist nicht verwunderlich, zumal die Binnenstrukturen des Thymus direktes Ziel der GvH-Alloreaktivität sind und die Thymusarchitektur bei Patienten mit GvHD schwer geschädigt ist [37]. Interessant war des weiteren die Beobachtung, dass zwischen autolog und allogenen transplantierten Patienten offensichtlich kein Unterschied in Beziehung auf T_{\min} und P zu bestehen scheint.

Die erhobenen Daten werfen ein neues Licht auf die Mechanismen der thymusabhängigen T-Zellrekonstitution nach Stammzelltransplantation im Kindesalter. Das Lebensalter des Kindes sowie eine eventuelle Vortherapie aufgrund einer malignen Erkrankung definieren ein Prätransplantationsniveau thymischer Funktionalität, das durch keinen der hier untersuchten transplantationsassoziierten Faktor verbessert werden kann. Jedoch kann das Auftreten einer akuten oder chronischen GvHD nach Transplantation die Thymusleistung negativ beeinflussen. Dieser vordefinierte Status der Thymusfunktion determiniert den Beginn der thymusabhängigen T-Zellregeneration nach der Transplantation hämatopoetischer Progenitorzellen. In der frühen Phase der

Immunrekonstitution führt eine erhebliche Proliferationsaktivität vorhandener T-Zellen zur Auffüllung des peripheren T-Zellpools, ein Prozess, der jedoch durch die begrenzte Anzahl von T-Zellvorläufern und die erhöhte Apoptoseneigung regenerierender T-Zellen limitiert ist [32, 36]. Nach Erreichen einer stabileren Phase der T-Zelldynamik weisen Patienten, die mit höheren Progenitorzellzahlen transplantiert wurden, höhere TREC- Werte auf. Dies dürfte durch eine größere Verfügbarkeit von lymphoiden Vorläuferzellen, die bereit sind in die subkapsuläre Zone des Thymus einzuwandern, bei Empfängern höherer Stammzell Dosen bedingt sein.

Bis heute existieren keine etablierten Verfahren zur Verbesserung der Thymusfunktion nach Stammzelltransplantation. Ein besseres Verständnis der Mechanismen der T-Zelldynamik im Rahmen der Immunrekonstitution wird jedoch neue Möglichkeiten der Vorbeugung und Behandlung von transplantationsassoziierten Komplikationen eröffnen.

Erste Studien im Tiermodell über die Verwendung von epithelialen und lymphozytären Wachstumsfaktoren zur Erhöhung der Thymuszellularität [38] sowie zur Verbesserung der Überlebensrate frischer Thymusemigranten [39, 40] weisen bereits in diese Richtung.

V. Zusammenfassung

Die thymusabhängige T-Zellregeneration ist ein wichtiger Weg der Immunrekonstitution nach Stammzelltransplantation im Kindesalter. Aus diesem Grund wurde die Thymusfunktion sowie die T-Zelldynamik bei 164 pädiatrischen Patienten zwischen 1 und 124 Monaten nach Transplantation durch Messung der Exzisionsprodukte der T-Zellrezeptorgenumlagerung (TRECs) und der spontanen Ki67-Expression in peripheren T-Zellsubpopulationen prospektiv untersucht. Analysiert wurde der Einfluss des Empfängeralters, des Konditionierungsregimes, der Erkrankung, der Art des Spenders oder des Transplantates, der verwendeten Stammzellzahl und der GvHD auf den Beginn sowie auch auf das Plateau der Thymusauswurfleistung. Die Rate der spontanen Proliferationsaktivität von naiven und Gedächtnis-T-Zellen war mit der Gesamt-T-

Zellzahl zum jeweiligen Zeitpunkt invers korreliert. Eine Multivariatanalyse zeigte, dass der Beginn der Wiederherstellung der Thymusfunktion allein mit dem Patientenalter ($P < 0,0002$) korrelierte. Das Plateau der thymischen Aktivität war jedoch bei Patienten, die eine größere Stammzelldosis erhalten hatten ($> 10^7$ CD34⁺/kg Körpergewicht), signifikant höher als bei solchen, denen nur weniger Stammzellen transplantiert werden konnten ($P < 0,0022$). Die anderen untersuchten Faktoren hatten keinen signifikanten Einfluss auf diese beiden Parameter. Demzufolge ist die durch Lymphopenie getriggerte Proliferation ein wichtiges Instrument der T- Zellhomöostase in der frühen Phase nach Stammzelltransplantation, kann aber zu einer Unterschätzung der Thymusfunktion führen. Beginn und Plateau der thymischen Aktivität sind unabhängig voneinander durch verschiedene transplantationsassoziierte Faktoren reguliert.

Literaturliste numerisch:

1. Mackall CL, Ganger L, Sheard MA, Cepeda R, Gress RE. T-cell regeneration after bone marrow transplantation: differential CD45 isoform expression on thymic-derived versus thymic-independent progeny. *Blood*. 1993; 82: 2585-2594.
2. Mackall CL, Gress RE. Pathways of T-cell regeneration in mice and humans: implications for bone marrow transplantation and immunotherapy. *Immunol. Rev.* 1997; 157:61-72.
3. Heitger A, Neu N, Kern H, et al. Essential role of the thymus to reconstitute naive (CD 45 RA+) T-helper cells after human allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*. 1997; 90: 850-857.
4. Douek DC, McFarland RD, Keiser PG, et al. Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature*. 1998; 396: 690-695.
5. Markert ML, Boeck A, Hale LP, et al. Transplantation of thymus tissue in complete DiGeorge Syndrome. *N Engl J Med*. 1999; 341: 1180-1189.
6. Takeshita S, Toda M, Yamagishi H. Excision products of the T-cell receptor gene support a progressive rearrangement model of the alpha/delta locus. *EMBO J*. 1989; 8: 3261-3270.
7. Livak F, Schatz DG. T-cell receptor alpha locus V(D)J recombination by-products are abundant in thymocytes and mature T cells. *Mol Cell Biol*. 1996; 16: 609-618.
8. Kong F, Chen CH, Cooper MD. Thymic function can be accurately monitored by the level of recent T cell emigrants in the circulation. *Immunity*. 1998; 8: 97-104.
9. Aquino VM, Douek DC, Berryman B, Johnson M, Jain VK, Collins RH. Evaluation of thymic output by measurement of T-cell-receptor gene rearrangement excisional circles (TREC) in patients who have received fludarabine. *Leuk Lymphoma*. 2003; 44: 343-348.
10. Chao NJ, Liu CX, Rooney B, et al. Nonmyeloablative regimen preserves „niches“ allowing for peripheral expansion of donor T-cells. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2002; 249-256.
11. Douek DC, Vescio RA, Betts MR, et al. Assessment of thymic output in adults after haematopoietic stem-cell transplantation and prediction of T-cell reconstitution. *Lancet*. 2000; 355: 1875-1881.
12. Hazenberg MD, Otto SA, Cohen Stuart JW, et al. Increased cell division but not thymic dysfunction rapidly affects the T-cell receptor excision circle content of the naive T-cell population in HIV-1 infection. *Nat Med*. 2000; 6: 1036-1042.
13. Hazenberg MD, Otto SA, de Pauw ES, et al. T-cell receptor excision circle and T-cell dynamics after allogeneic stem cell transplantation are related to clinical events. *Blood*. 2002; 99: 3449-3453
14. Hochberg EP, Chillemi AC, Wu CJ, et al. Quantitation of T-cell neogenesis in vivo after allogeneic bone marrow transplantation in adults. *Blood*. 2001; 98: 1116-1121.
15. Schonland SO, Zimmer JK, Lopez-Benitez CM, et al. Homeostatic control of T-cell generation in neonates. *Blood*. 2003; 102:1428-1434.
16. Svaldi M, Lanthaler AJ, Dugs M, et al. T-cell receptor excision circles: a novel prognostic parameter for the outcome of transplantation in multiple myeloma patients. *Br. J Haematol*. 2003; 122: 795-801.
17. Weinberg K, Blazar BR, Wagner JE, et al. Factors affecting thymic function after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2001; 168:4968-4979.

18. Ye P, Kirschner DE. Reevaluation of T-cell receptor excision circles as a measure of human recent thymic emigrants. *J Immunol.* 2002; 168: 4968-4979.
19. Hazenberg MD, Borghans JA, de Boer RJ, Miedema F. Thymic output: a bad TREC record. *Nat Immunol.* 2003; 4: 97-99.
20. Eyrich M, Leiler C, Lang P, et al. A prospective comparison of immune reconstitution in pediatric recipients of positively selected CD34(+) peripheral blood stem cells from unrelated donors vs recipients of unmanipulated bone marrow from related donors. *Bone Marrow Transplant.* 2003; 32:379-90.
21. Eyrich M, Leiler C, Croner T, et al. Impaired T-cell activation and cytokine productivity after transplantation of positively selected CD34+ allogeneic hematopoietic stem cells. *Hematol Journal.* 2004; 5:329-340.
22. Mitra DK, Singh HP, Singh M, et al. Reconstitution of naive T- cells and type 1 function after autologous peripheral stem cell transplantation: impact on the relapse of original cancer: *Transplantation.* 2002; 73: 1336-1339.
23. Talvensaari K, Clave E, Douay C, et al. A broad T-cell repertoire diversity and an efficient thymic function indicate a favorable long-term immune reconstitution after cord blood stem cell transplantation. *Blood.* 2002; 99: 1458-1464.
24. Storek J, Joseph A, Dawson MA, Douek DC, Storer B, Maloney DG. Factors influencing T-lymphopoiesis after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Transplantation.* 2002; 73: 1154-1158.
25. Savage WJ, Bleesing JJ, Douek D, et al. Lymphocyte reconstitution following nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation follows two patterns depending on age and donor/recipient chimerism. *Bone Marrow Transplant.* 2001; 28: 463-471.
26. Patel DD, Gooding ME, Parrott RE, Curtis KM, Haynes BF, Buckley RH. Thymic function after hematopoietic stem-cell transplantation for the treatment of severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med.* 2000; 342: 1325-1332.
27. Lewin SR, Heller G, Zhang L, et al. Direct evidence for new T-cell generation by patients after either T-cell-depleted or unmodified allogeneic hematopoietic stem cell transplantations. *Blood.* 2002; 100: 2235-2242.
28. Mascher B, Schlenke P, Seyfarth M. Expression and kinetics of cytokines determined by intracellular staining using flow cytometry. *J Immunol Methods.* 1999; 223: 115-121.
29. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation- associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol.* 1984; 133: 1710-1715.
30. Murali Krishna K, Ahmed R. Cutting edge: naive T-cells masquerading as memory cells. *J Immunol.* 2000; 165:1733-1737.
31. Gudmundsdottir H, Turka LA. A closer look at homeostatic proliferation of CD4+ T-cells: costimulatory requirements and role in memory formation. *J Immunol.* 2001; 167: 3699- 3707.
32. Poulin JF, Sylvestre M, Champagne P, et al. Evidence for adequate thymic function but impaired naive T-cell survival following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in the absence of chronic graft versus host disease. *Blood.* 2003; 102: 4600- 4607.
33. Hassan J, Reen Dj. Human recent thymic emigrants - identification, expansion, and survival characteristics. *J Immunol.* 2001; 167: 1970-1976.

34. Roux E, Dumont-Girard F, Starobinski M, et al. Recovery of immune reactivity after T-cell-depleted bone marrow transplantation depends on thymic activity. *Blood*. 2000; 96: 2299-2303.
35. Eyrich M, Lang P, Lal S, et al. A prospective analysis of the pattern of immune reconstitution following transplantation of HLA- separate hematopoietic stem cells from parental donors. *Br J Haematol*. 2001; 114: 422-432.
36. Heibib NC, Deas O, Rouleau M, et al. Peripheral blood T-cells generated after allogeneic bone marrow transplantation: lower levels of bcl-2 protein and enhanced sensitivity to spontaneous and CD95-mediated apoptosis in vitro. Abrogation of the apoptotic phenotype coincides with the recovery of normal naive/primed T-cell profiles. *Blood*. 1999; 94: 1803-1813.
37. Muller-Herlink HK, Sale GE, Brisch B, Storb R. Pathology of the thymus after allogeneic bone marrow transplantation in man. A histologic immunohistochemical study of 36 patients. *Am J Pathol*. 1987; 129: 242-256.
38. Min D, Taylor PA, Panoskaltis-Matar A, et al. Protection from thymic epithelial cell injury by keratinocyte growth factor: a new approach to improve thymic and peripheral T-cell reconstitution after bone marrow transplantation. *Blood*. 2002; 99: 4592-4600.
39. Fry TJ, Moniuszko M, Creekmore S, et al. IL-7 therapy dramatically alters peripheral T-cell homeostasis in normal and SIV- infected nonhuman primates. *Blood*; 2003; 101: 2294-2299.
40. Broers AE, Posthumus-van Sluijs SJ, Spits H, et al. Interleukin-7 improves T-cell recovery after experimental T-cell-depleted bone marrow transplantation in T-cell-deficient mice by strong expansion of recent thymic emigrants. *Blood*. 2003; 102: 1534-1540.
41. Schaefer UW, Beelen DW. Knochenmarktransplantation, Karger GmbH, Basel.
42. Thomas ED. The role of marrow transplantation in the eradication of malignant disease. *Cancer*. 1982; 49:1963-1969.
43. Armitage JO. Bone marrow transplantation. *N Engl J Med*. 1994; 330: 827-835.
44. Storb R. Human bone marrow transplantation. *Transpl Proc* 1983; 15: 1379-1384.
45. Niethammer D, Dopfer R, Klingebiel T, Riehm H, Schellong G, Henze G, Bender-Götze C, Haas RJ, Schmitz N, Friedrich W, Ebell W, Stollmann B. Actual role and perspectives of BMT in children. *Bone Marrow Transpl*. 1989; 4: 7-11.
46. Trigg ME. Bone marrow transplantation using alternative donors. *Am J Ped Hemat/Oncol*. 1993; 15: 141-149.
47. Santos GW. Bone marrow transplantation in leukemia. *Cancer*. 1984; 54: 2732-2740.
48. Thomas ED, Sanders JE, Flournoy N, Johnson FL, Bruckner CD, Clift RA, Fefer A, Goodell BW, Storb R, Weiden PL. Marrow transplantation for patients with acute lymphoblastic leukemia: A long term follow up. *Blood*. 1983; 62: 1139-1141.
49. Miyamura K, Barrett AJ, Kadera Y, Saito H. Minimal residual disease after bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia and implications for graft-versus-leukemia effect: A review of recent results. *Bone Marrow Transpl*. 1994; 14: 201-209.
50. Schmitz G, Rothe G. Durchflußzytometrie in der klinischen Zelldiagnostik. Schattauer Verlag Stuttgart. 1994.
51. Eckhardt R. Grundlagen der Durchflußzytometrie. Problemerkennung und –bewältigung. *MTA*. 1994; 9: 992-994.

52. Eckhardt R. Grundlagen der Durchflußzytometrie. Problemerkennung und –bewältigung. MTA. 1995; 10: 10-12.
53. Parks DR, Herzenberg LA. Fluorescence-activated cell sorting: Theory, experimental optimization, and applications in lymphoid cell biology. *Methods in Enzymology*. 1984; 108: 197-241.
54. Gutensohn K, Serke S. Durchflußzytometrische Analyse CD34 exprimierender hämatopoetischer Zellen in Blut und Zytaphereseprodukten. *Infusionstherapie und Transfusionsmedizin*. 1996; 23: Supp. 2, 2-16.
55. Santos GW. History of bone marrow transplantation. *Clinics in Haematology*. 1983; 12: 611-639.
56. Eyrich M, Croner T, Leiler C, Lang P, Bader P, Klingebiel T, Niethammer D, Schlegel PG. Distinct contributions of CD4+ and CD8+ naive and memory T-cell subsets to overall TCR-repertoire complexity following transplantation of T-cell depleted CD34 selected hematopoietic progenitor cells from unrelated donors. *Blood*. 2002; 100:1915-1918.
57. Janeway CA. *Immunobiology*. 1997; 210-212.
58. Mackall CL, Bare CV, Granger LA, Sharrow SO, Titus JA, Gress RE. Thymic-independent T cell regeneration occurs via antigen-driven expansion of peripheral T cells resulting in a repertoire that is limited in diversity and prone to skewing. *J Immunol*. 1996;156:4609-4616.

Aus dieser Arbeit hat sich die folgende Veröffentlichung ergeben

Eyrich M, Wollny G, Tzaribachev N, Dietz K, Brugger D, Bader P, Lang P, Schilbach K, Winkler B, Niethammer D, Schlegel PG. Onset of thymic recovery and plateau of thymic output are differentially regulated after stem cell transplantation in children. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2005; March 11(3): 194-205.

Von Herzen danken möchte ich:

meinen Eltern für die Liebe, Fürsorge und Geborgenheit in diesem Leben

meinen Mentoren Herrn Dr. h.c. H. W. Hector und Herrn Th. Schleicher für die aufrichtige Freundschaft und Hilfe, ohne deren Unterstützung meine ganze Ausbildung und die vorliegende Arbeit nicht möglich wären; ganz besonderer Dank gilt Ihnen dafür, dass Sie für mich immer da waren, auch wenn ich nicht mehr weiter wusste

meinem Freund und Kollegen Matthias Eyrich, ohne dessen ständigen, weisen Rat und tatkräftige Hilfe viele nicht nur wissenschaftliche Hürden unüberwindbar wären

Gertie Schöner- Aupor und Botschafter a.D. Peter Metzger, die keine Mühe scheuten, mir den fantastischen Start ins Leben zu ermöglichen, und auch Erika, Reiner, Elli, Niki und Joru für ihre wahre Freundschaft und den unbezwingbaren Glauben an dem vorliegenden Endergebnis

Herrn Prof. Dr. med. D. Niethammer für all seine Unterstützung, sein Verständnis und ständige Hilfe

Frau und Herrn Dr. rer. nat. Bock, Herrn Betz und Herrn Mosch für die Starthilfe meiner fachärztlichen Ausbildung und die ständige Ermutigung durchzuhalten

Herrn Prof. Dr. med. P.G. Schlegel dafür, dass er mich ins Labor brachte und Beate Mascher für die gute Einarbeitung und Ihre Freundschaft

Gernot Wollny für seine Freundschaft und die vielen Stunden, die er mit mir im Labor opferte

meinen Kollegen, die mir immer wieder den Rücken freihielten und so die Laborarbeit ermöglichten (Sandra Huber, Markus Koch, Gerald Greil, Karim El Kasmi, Kathrin Maaß, Janina Caliebe, Marko Wilke, Andrea Marx)

Antje und Ottmar, Steffi und Thomas für ihre geniale Freundschaft, fortwährende Unterstützung und die Stütze, die sie mir immer waren

Gabrielle und Ronald Gerns, für die Freundschaft und das rege Interesse an meinem Werdegang

Bärbel dafür, dass sie nicht aufhörte an mich zu glauben und mir ständig mit weisem Rat zur Seite stand

all meinen Freunden, die in Zeiten des Zweifels mir Stütze und Hilfe waren

meinem Herrn Jesus, für die Kraft und den Mut durchzuhalten und der Liebe, die ich jeden Tag aufs Neue erfahren darf.

Lebenslauf

Name: Nikolay Tzaribachev
Geburtsdatum: 06. September 1969
Geburtsort: Sofia, Bulgarien

Schulbildung:

Grundschule Sofia, Bulgarien
Grundschule, Berlin
Deutsches Gymnasium in Sofia und Fachschule für Innenarchitektur
Allgemeine Hochschulreife
Armeedienst

Akademische Ausbildung/praktische Tätigkeit:

1989- 96 Studium der Medizin an der Medizinischen Universität in Sofia /
Staatsexamen
für 3 Monate Hospitation an der Universitäts- Kinderklinik in Tübingen
Assistent der Leiterin (Frau G. Metzger, Ehefrau des Deutschen Bot-
schafers) des Büros für humanitäre Hilfe an der Deutschen Botschaft in
Sofia
Facharztausbildung an der Univ.- Kinderklinik in Tübingen
in dieser Zeit Experimentelle Doktorarbeit an der Universitätsklinik für
Kinderheilkunde und Jugendmedizin, Abteilung Hämatologie / Immuno-
logie, Doktorvater und Ärztlicher Direktor Prof. Dr. med. D. Niethammer
Mitarbeiter Kleinkinderlungenfunktionsdiagnostik- und Ergospirometrie-
Forschungsgruppe (Leiter Dr. med. W. Baden)

seit Anfang 2004 Assistenzärztliche Tätigkeit an der pädiatrisch-rheumatologischen
Ambulanz der Universitätsklinik für Kinderheilkunde und Jugend-
medizin, hier auch Teilnahme an der Weiterentwicklung von ARDIS®
(rheumatologische Datenbank)

Juni 2005 Facharztanerkennung für das Fach Kinder- und Jugendmedizin

Publikationen:

Eyrich M, Wollny G, Tzaribachev N, Dietz K, Brugger D, Bader P, Lang P, Schilbach K, Winkler B, Niethammer D, Schlegel PG. Onset of thymic recovery and plateau of thymic output are differentially regulated after stem cell transplantation in children. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2005; March 11(3): 194-205.

K-O Dubowy, W Baden, C Camphausen, H Meyer, M Hofbeck; Vorschlag für ein einheitliches spiroergometrisches Belastungsprotokoll (Laufband) der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Kardiologie und der Gesellschaft für Pädiatrische Pneumologie (Mitarbeit/in Druck).

Mrusek S, Marx A, Kummerle-Deschner J, Tzaribachev N, Enders A, Riede UN, Warnatz K, Dannecker GE, Ehl S., Development of granulomatous common variable immunodeficiency subsequent to infection with *Toxoplasma gondii*; *Clin Exp Immunol.* 2004 Sep;137(3):578-83.

Posterpräsentationen:

TNF alpha blockade in Takayasu arteriitis- PReS meeting 2004, Kosice, Slovakia

Autologous bone marrow transplantation in a girl with systemic sclerosis- a 6 year follow up; PReS meeting 2005, Paris, Frankreich

Anakinra in the treatment of Muckle-Wells syndrome- a series of four cases; PReS meeting 2005, Paris, Frankreich

Successful single dose Rituximab in a pediatric patient with treatment resistant life threatening SLE; PReS meeting 2005, Paris, Frankreich

Rare cervical manifestation of psoriatic arthritis- favourable response to etanercept; PReS meeting 2005, Paris, Frankreich

Mesenchymal stem cells isolated from synovial fluid of patients with juvenile idiopathic arthritis exert immunomodulatory functions; PReS meeting 2005, Paris, Frankreich

ARDIS ®²- meeting the needs of different users- an ongoing project/project outline; PReS meeting 2005, Paris, Frankreich

Pulmonal veno-okklusive Erkrankung als Ursache einer pulmonalen Hypertonie bei einem vierjährigen Kind, 36. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Kardiologie (DGPK), 2004

Laufbandprotokoll der DGPK- Atemfrequenz und Atemzugvolumina in Ruhe, an der anaeroben Schwelle und bei Ausbelastung- Referenzwerte für gesunde Mädchen und Jungen, 36. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Kardiologie (DGPK), 2004

Changes of lung function in infants with congenital heart disease and univentricular circulation; European Respiratory Society meeting 2004, Glasgow, England.